

10/500.646

2/25/05



REC'D 24 MAR 2003

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

BEST AVAILABLE COPY

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JAN. 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI

cerfa

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W/260899

<p>REMISSION DES PIÈGES Réervé à l'INPI 10 JAN 2002 69 INPI LYON 0200265 10 JAN. 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI Vos références pour ce dossier <i>(facultatif) IT/SC/B05B3851FR</i> </p>		<p>1. NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet GERMAIN & MAUREAU BP 6153 69466 LYON CEDEX 06</p>	
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p>			
<p>2. NATURE DE LA DEMANDE <input type="checkbox"/> Cochez l'une des 4 cases suivantes</p>			
<p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/></p>			
<p>Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/></p>			
<p>Demande divisionnaire <input type="checkbox"/></p>			
<p><i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i></p>		<p>N°</p>	<p>Date / / </p>
<p><i>Demande de brevet initiale</i></p>		<p>N°</p>	<p>Date / / </p>
<p>Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i></p>		<p>N°</p>	<p>Date / / </p>
<p>3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>PROCEDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON</p>			
<p>4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p>Pays ou organisation Date / / N°</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>	
<p>5. DEMANDEUR</p>		<p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>	
<p>Nom ou dénomination sociale</p>		<p>BIO MERIEUX</p>	
<p>Prénoms</p>			
<p>Forme juridique</p>		<p>Société Anonyme</p>	
<p>N° SIREN</p>		<p>1</p>	
<p>Code APE-NAF</p>		<p>1</p>	
<p>Adresse</p>	<p>Rue</p>	<p>Chemin de l'Orme</p>	
	<p>Code postal et ville</p>	69280	MARCY L'ETOILE
<p>Pays</p>		<p>FR</p>	
<p>Nationalité</p>		<p>française</p>	
<p>N° de téléphone (facultatif)</p>			
<p>N° de télécopie (facultatif)</p>			
<p>Adresse électronique (facultatif)</p>			

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

10 JAN 2002 Réserve à l'INPI
REMISE DES PIÈCES
DATE 69 INPI LYON
LIEU
N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0200265

DB 540 W /25089

6 MANDATAIRE	
<p>Nom GUERRE Prénom Dominique Cabinet ou Société Cabinet GERMAIN & MAUREAU</p>	
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel CPI 921104	
Adresse	Rue BP 6153
	Code postal et ville 69466 LYON CEDEX 06 / FR
N° de téléphone (facultatif) 04 72 69 84 30	
N° de télécopie (facultatif) 04 72 69 84 31	
Adresse électronique (facultatif) dominique.guerre@germainmaureau.com	
7 INVENTEUR (S)	
<p>Les inventeurs sont les demandeurs <input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</p>	
8 RAPPORT DE RECHERCHE	
<p>Établissement immédiat ou établissement différé <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p>	
Paiement échelonné de la redevance Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES	
<p>Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requise antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):</p>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<p>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</p> <p>Dominique GUERRE CPI 921104</p>	
<p>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</p> <p><i>Stephane</i> <i>LE CHAPELAT</i></p>	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention a trait au domaine de la détermination d'une espèce animale appelée ci-après d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient, lui-même obtenu à partir d'au moins ladite espèce. Les produits à partir desquels s'exerce la détermination selon 5 la présente invention sont par exemple des aliments ou denrées alimentaires à destination de l'homme ou des animaux, des produits cosmétiques, et, de manière générale des produits susceptibles de contenir des ingrédients d'origine animale, ou au contraire des produits dans lesquels ces extraits sont interdits.

10 Par exemple, l'identification des espèces animales présentes dans les aliments peut être nécessaire dans de nombreux domaines d'activités. Une première raison est de lutter contre les fraudes alimentaires où sont substituées certaines espèces animales par des espèces moins chères, comme le remplacement de lièvre par du lapin. Une seconde raison 15 est de santé publique, comme notamment lors de l'épidémie d'encéphalite spongiforme bovine ou ESB, maladie due à l'utilisation de farines animales carnées d'origine bovine pour l'alimentation des bovins. Une troisième raison est d'ordre religieux, afin de vérifier par exemple l'absence de porc dans les aliments. Une quatrième raison est d'ordre législatif, lors 20 notamment de la vérification de l'absence d'espèces protégées dans les aliments.

25 Trois principales approches d'identification sont actuellement décrites dans la littérature ; ces méthodes sont basées sur une analyse tissulaire ou microscopique, sur une analyse protéique, et/ou sur une analyse génétique.

L'analyse tissulaire consiste ainsi à déterminer la présence dans des échantillons de farines destinées à l'alimentation animale, de fragments d'os. Cette technique, décrite notamment dans l'article de Michard, Revue de l'alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997, bien que sensible, est 30 fastidieuse et repose sur l'interprétation d'un expert. Elle est donc difficilement comparable d'un laboratoire à un autre. De plus, par nature, elle ne peut détecter l'adjonction de tissus mous, tels que abats, serum, tissus sanguins, gélatine.

35 Parmi les analyses protéiques utilisées, on distingue principalement dans la littérature trois groupes de méthodes permettant l'identification d'espèces animales présentes dans un échantillon donné.

Le premier groupe de méthodes comprend des techniques d'électrophorèse de protéines, qui consiste à détecter les protéines cibles solubles par une coloration enzymatique spécifique. Le diagnostic est obtenu après électrophorèse sur gel polyacrylamide par exemple. Toutefois, 5 cette technique ne peut être réalisée qu'avec des tissus frais ou congelés, non transformés, car une période de cuisson de l'aliment est un exemple de transformation susceptibles d'altérer les protéines. Cette technique ne peut donc pas être appliquée à la détection d'espèces animales présentes dans les farines végétales, qui subissent lors de leur fabrication des phases 10 de cuisson.

Le deuxième groupe de méthodes est basé sur des techniques immunologiques, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les protéines cibles solubles. La technique « Ouchterlony », ou immunodiffusion double, méthode utilisée pour différencier des antigènes dans un mélange, peut 15 être utilisée. Mais cette technique présente l'inconvénient majeur d'impliquer des réactions croisées avec les épitopes d'autres espèces. L'utilisation de techniques ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permet une meilleure discrimination entre les espèces, et ces techniques peuvent être appliquées à de la viande cuite lorsque des anticorps dirigés 20 contre des épitopes thermorésistants sont utilisés. Toutefois, des problèmes de spécificité sont encore observés. A titre indicatif, des anticorps polyclonaux dirigés contre les épitopes thermorésistants de poulet ne sont pas suffisamment spécifiques pour déterminer s'il s'agit de viande de poulet ou de viande de dinde.

25 Le troisième groupe de méthodes comprend les techniques chromatographiques (HPLC) utilisées pour caractériser des protéines solubles de muscles. Toutefois, ces techniques restent lourdes financièrement et techniquement, et ne peuvent être appliquées qu'à des tissus frais ou récemment congelés.

30 Les inconvénients de ces trois méthodes sont principalement dus à leur dépendance envers la caractérisation de protéines qui sont thermosensibles, se dénaturent lors d'une période de cuisson des aliments, perdent leur activité biologique après la mort de l'animal, et dont la présence est souvent fonction du type de cellules qui est examiné.

35 Il est ainsi préférable d'analyser directement l'ADN, plutôt que les protéines de l'échantillon, pour identifier la ou les espèces animales

d'origine présentes dans un échantillon donné, l'ADN étant identique dans tous les types cellulaires d'un même animal et stable en comparaison avec les protéines. Une troisième approche consiste donc à analyser l'ADN présent dans l'échantillon. Depuis peu de temps, on trouve ainsi dans la 5 littérature des méthodes basées notamment sur l'utilisation d'enzymes de restriction ou de marqueurs génétiques, ces méthodes présentant l'avantage de pouvoir être appliquées à des produits transformés, en particulier après traitement thermique.

La détermination nucléique peut faire appel à des enzymes de 10 restriction, ou technique dite RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, voir notamment Meyer et al, Journal of AOAC International, vol 78 n°6, pp 1542-1551, 1995). Les enzymes de restriction coupent l'ADN, préalablement extrait de l'échantillon à analyser, à des endroits précis de la macromolécule. Il suffit alors de comparer, par simple 15 électrophorèse, les fragments obtenus avec ceux d'échantillons témoins représentatifs de l'espèce à identifier. Toutefois, l'analyse des résultats obtenus par cette technique est très délicate, en particulier lorsque plusieurs espèces animales sont présentes dans l'échantillon.

La détermination nucléique peut aussi consister à séquencer un 20 marqueur ubiquitaire, tel que le cytochrome B de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial est une cible connue pour ce genre d'analyse puisque chaque mitochondrie contient de une à dix molécules d'ADN mitochondrial, et chaque cellule renferme de quelques dizaines à quelques milliers de mitochondries, ce qui permet de travailler sur une très faible quantité 25 d'échantillon. Ainsi, Bartlett & Davidson (Biotechniques, vol. 12, n°3, 1992) décrivent une méthode appelée FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing). Cette méthode consiste à i) isoler l'ADN présent dans un échantillon biologique, ii) amplifier cet ADN par PCR par l'utilisation d'amorces spécifiques du gène cytochrome B mitochondrial, les 30 amorces étant choisies dans la partie du gène hautement conservée au cours de l'évolution et iii) séquencer le segment d'ADN amplifié. La séquence est ensuite utilisée pour une analyse phylogénétique à l'aide d'une base de données, permettant l'identification de l'espèce animale présente initialement dans l'échantillon. Si cette méthode présente 35 l'avantage d'être rapide et utilisable sur tout type d'aliments (frais, congelés, transformés...), elle présente toutefois l'inconvénient majeur de

ne pas permettre l'analyse de mélanges d'espèces, à partir de mélanges de séquences amplifiées issues du même marqueur polymorphe ubiquitaire, et reste ainsi réservée à des matières premières homogènes.

L'analyse peut également consister à amplifier un marqueur spécifique d'une espèce donnée. Ainsi, Lahiff et al (Molecular and Cellular Probes, vol.15, pp27-35, 2001) décrivent l'identification d'espèce ovine, bovine ou aviaire présente dans un échantillon par l'utilisation par PCR d'amorces particulières, spécifiques à chaque espèce. Si cette méthode permet l'identification spécifique et rapide de telle ou telle espèce, elle ne

10 peut être appliquée simultanément à la détection de plusieurs espèces. Des PCR successives sont alors nécessaires si on souhaite détecter plusieurs espèces. On retrouve ainsi dans l'art antérieur la détection de six espèces animales par l'utilisation d'une PCR multiplex (Matsuda et al, 1999 Meat Sciences, (1999), 145-148). Toutefois, cette technique reste délicate et

15 difficile à appliquer et implique pratiquement une connaissance préalable des espèces recherchées. Cette technique n'est cependant pas applicable en aveugle, c'est à dire sans connaissance préalable des espèces susceptibles d'être présentes dans l'échantillon. Elle ne permet pas d'avoir des résultats quantitatifs en raisons des difficultés dues à l'amplification

20 multiplex et des possibilités de mésappariements. De plus, cette technique oblige à disposer d'un grand nombre d'amorces spécifiques si l'on veut tester un grand nombre d'espèces, ce qui est peu réalisable en pratique en raison de problèmes de sensibilité et de spécificité. Enfin, si une espèce n'est pas représentée dans le jeu d'amorces mais néanmoins présente dans

25 l'échantillon à analyser, le résultat sera faussé.

Il existe donc un besoin important pour une technique qui, tout en restant générique, puisse détecter une ou plusieurs espèces, même présentes en grand nombre dans le même échantillon à analyser ou en très faible quantité, et sans connaissance préalable des espèces présentes.

30 En effet, si dans un produit, l'espèce non désirée doit être présente dans des quantités supérieures à 5 % par rapport à l'espèce normalement présente pour qu'il y ait effectivement fraude, ce qui allège les performances exigées pour le test de diagnostic moléculaire, il en est autrement dans le cas de produits dans lesquels la présence de produits

35 d'origine animale est interdite. Par exemple dans le cas des farines employées en France pour l'alimentation animale depuis le 1^{er} janvier 2001,

les traces de teneur en produit d'origine animale sont recherchées, et la contrainte technique est importante en terme de sensibilité de la méthode car la majeure partie du matériel est d'origine végétale et l'adjonction de matériel animal varie entre 0,1 et 5% poids/poids.

5 Il existe donc un besoin de disposer d'un outil de détermination, permettant l'identification ou la détection qualitative et/ou quantitative d'espèces animales, en aveugle, c'est à dire sans a priori sur l'identité de l'espèce recherchée, susceptible d'être mis en œuvre de manière simple, tout en restant spécifique, fiable et fidèle, et susceptible d'être mis en
10 œuvre dans un milieu pouvant contenir des ingrédients obtenus à partir de plusieurs espèces animales.

Le problème à résoudre présente une complexité importante. La détermination doit être possible en aveugle, c'est à dire que l'échantillon est susceptible de contenir ou de ne pas contenir des ingrédients obtenus à
15 partir d'une ou de plusieurs espèces animales et ces espèces d'origine sont inconnues. Si l'échantillon contient des ingrédients obtenus à partir d'espèces animales, les espèces d'origine doivent être déterminées et sont susceptibles d'être voisines, et la détermination doit être possible en ne faisant qu'une seule analyse, avec un seul réactif et une seule étape
20 d'amplification, sans étape préalable de prédétermination par exemple du groupe d'espèces ou mise en œuvre de batteries de tests permettant par exemple de classer les réactifs par genres ou espèces pour éviter par exemple les réactions croisées.

A cet effet, la Demandante a découvert un ensemble de
25 séquences constitué par le groupe comprenant les séquences SEQ ID Nos 1 à 232, leurs séquences respectivement complémentaires, et toutes séquences homologues, comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence, qui permettent par la
30 mise en œuvre de méthodes d'analyse dites de biologie moléculaire, la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce.

Avant d'exposer l'invention, différents termes utilisés dans la
35 description et les revendications sont définis ci-après.

- Une "détermination" s'entend comme étant l'identification ou la détection ou analyse quantitative et/ou qualitative d'une espèce animale.
- Une "espèce animale" s'entend comme étant la catégorie la plus simple utilisée dans le classement des espèces vivantes ou taxonomie.

5 Les espèces vivantes sont classées en catégories appelées taxons, les plus importants taxons sont le Règne (animal ou végétal), l'Embranchement, la Classe, l'Ordre, la Famille, le Genre, et l'Espèce. Les Oiseaux, Poissons et Mammifères sont des classes d'animaux vertébrés.

- ~~Par "espèce animale d'origine" on entend l'espèce animale, de l'animal dont les tissus, quels qu'ils soient, ont été utilisé comme matière première pour la préparation du ou des ingrédients de l'échantillon. du produit soumis à la détermination selon la présente invention.~~
- Une "méthode de biologie moléculaire", est une méthode basée sur l'amplification enzymatique de cibles nucléiques (ADN et/ou 15 ARN) in vitro et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques.
- Un "échantillon" est toute partie obtenue directement ou indirectement à partir d'un produit, d'un matériau, d'une matière, de départ, lui-même susceptible de contenir au moins un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale dite d'origine. En conséquence de 20 cette définition, l'échantillon à déterminer conformément à la présente invention est susceptible de contenir ledit ingrédient d'origine animale, à partir duquel on identifie ou détecte la ou les espèces animales entrées dans la composition ou constitution du produit, matériau, ou matière de départ. Au sens de la présente invention, le produit de départ peut être un 25 matériel biologique, un aliment ou denrée alimentaire, par exemple à base de viande ou poisson, un produit cosmétique, etc..
- Par "étape de lyse", on entend une étape capable de libérer les acides nucléiques contenus dans les enveloppes protéiques et/ou lipidiques des microorganismes (comme des débris cellulaires qui perturbent les 30 réactions ultérieures). A titre d'exemple, on peut utiliser les méthodes de lyse telles que décrite dans les demandes de brevet de la Demanderesse : WO-A-00/05338 sur la lyse mixte magnétique et mécanique, WO-A-99/53304 sur la lyse électrique, et WO-A-99/15321 sur la lyse mécanique.

35 L'homme du métier pourra utiliser d'autres méthodes de lyse bien connues, telles que les chocs thermiques ou osmotiques ou les lyses

chimiques par des agents chaotropiques tels que les sels de guanidium (US-A-5,234,809).

- Par "purification", on entend la séparation entre les acides nucléiques et les autres constituants cellulaires relargués dans l'étape de 5 lyse. Cette étape permet généralement de concentrer les acides nucléiques. A titre d'exemple, on peut utiliser des particules magnétiques éventuellement revêtues d'oligonucléotides, par adsorption ou covalence (voir à ce sujet les brevets US-A-4,672,040 et US-A-5,750,338), et ainsi purifier les acides nucléiques qui se sont fixés sur ces particules 10 magnétiques, par une étape de lavage. Cette étape de purification des acides nucléiques est particulièrement intéressante si l'on souhaite amplifier ultérieurement lesdits acides nucléiques. Un mode de réalisation particulièrement intéressant de ces particules magnétiques est décrit dans les demandes de brevet déposées par la Demanderesse sous les références 15 suivantes : WO-A-97/45202 et WO-A-99/35500.

Dans la dernière de ces demandes de brevet, il s'agit de particules magnétiques thermosensibles ayant chacune un noyau magnétique recouvert d'une couche intermédiaire. La couche intermédiaire est elle-même recouverte par une couche externe à base d'un polymère 20 susceptible d'interagir avec au moins une molécule biologique, par exemple acide nucléique ; le polymère externe est thermosensible et présente une température critique inférieure de solubilité (LCST) prédéterminée comprise entre 10 et 100°C et de préférence entre 20 et 60°C. Cette couche externe est synthétisée à partir de monomères cationiques, qui génèrent un 25 polymère ayant la capacité de lier les acides nucléiques. Cette couche intermédiaire isole les charges magnétiques du noyau, afin d'éviter les problèmes d'inhibition des techniques d'amplification de ces acides nucléiques.

Un autre exemple intéressant de méthode de purification des 30 acides nucléiques est l'utilisation de silice soit sous forme de colonne (nécessaires Qiagen par exemple), soit sous forme de particules inertes [Boom R. et al., J. Clin. Microbiol., 1990, n°28(3), p. 495-503] ou magnétiques (Merck: MagPrep® Silica, Promega: MagneSil™ Paramagnetic particles). D'autres méthodes très répandues reposent sur des résines 35 échangeuses d'ions en colonne (nécessaires Qiagen par exemple) ou en format particulaire paramagnétique (Whatman: DEAE-Magarose) [Levison

PR et al., J. Chromatography, 1998, p. 337-344]. Une autre méthode très pertinente mais non exclusive pour l'invention est celle de l'adsorption sur support d'oxyde métallique (société Xtrana: matrice Xtra-BindTM).

- Une "séquence", ou un "fragment nucléotidique", ou un oligonucléotide, ou un polynucléotide, est un enchaînement de motifs nucléotidiques assemblés entre eux par des liaisons ester phosphorique, caractérisé par la séquence informationnelle des acides nucléiques naturels, susceptibles de s'hybrider à un fragment nucléotidique, l'enchaînement pouvant contenir des monomères de structures différentes et être obtenu à

5 partir d'une molécule d'acide nucléique naturelle et/ou par recombinaison génétique et/ou par synthèse chimique.

- Un "motif" est dérivé d'un monomère qui peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base azotée ; dans l'ADN le sucre est le désoxy-2-ribose, dans l'ARN le sucre est le ribose ; selon qu'il s'agisse de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine ; ou bien le monomère est un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre d'exemple, la modification peut intervenir soit au niveau des bases, 10 avec des bases modifiées telles que l'inosine, la méthyl-5désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5désoxyuridine ou toute autre base modifiée capable d'hybridation, soit au niveau du sucre, par exemple le remplacement d'au moins un désoxyribose par un polyamide (P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991), soit encore au niveau du groupement phosphate, par exemple son remplacement par des esters notamment choisis parmi les 15 diphosphates, alkyl- et aryl-phosphonates et phosphorothioates,

- Par "séquence informationnelle", on entend toute suite ordonnée de motifs de type nucléotidique, dont la nature chimique et 20 l'ordre dans un sens de référence constituent une information de même qualité que celle des acides nucléiques naturels.

- Par "hybridation", on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un 25 double brin avec des liaisons hydrogène stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique "capable de s'hybrider" avec un polynucléotide est

un fragment pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation 5 est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques.

La "stringence" peut également être fonction des paramètres de 10 la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes cibles utilisées. Toutes ces données 15 sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier.

En général, selon la longueur des sondes cibles utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 20 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M.

- Une "sonde" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 monomères, notamment de 6 à 35 monomères, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique ayant, dans le cas 25 présent, une séquence nucléotidique comprise par exemple dans un ARN ribosomique, l'ADN obtenu par transcription inverse dudit ARN ribosomique et l'ADN (appelé ici ADN ribosomique ou ADNr) dont ledit ARN ribosomique est le produit de transcription ; une sonde peut être de capture ou de détection.

30 - Une "sonde de capture" est immobilisée ou immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption.

- Une "sonde de détection" peut être marquée au moyen d'un marqueur choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes (notamment 35 une peroxydase, une phosphatase alcaline, ou une enzyme susceptible d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des

composés chimiques chromophores, des composés chromogènes, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

5 - Une "amorce" comprend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques et possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une technique d'amplification, dans un procédé de séquençage, dans une méthode de transcription inverse, etc.

10 - "L'homologie" caractérise le degré d'identité de deux fragments nucléotidiques comparés, dont les critères retenus pour la présente invention sont définis ci-après.

Les sondes et amorces selon l'invention sont choisies parmi :

15 (a) les séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

20 (b) les séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M, avec une quelconque des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description,

25 (c) les séquences homologues à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, et des séquences complémentaires à chacune des séquences identifiées dans le listage de séquences annexé à la description, respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite 30 quelconque séquence ; à titre d'exemple, un fragment (c) comporte 10 nucléotides parmi lesquels 5 nucléotides contigus appartiennent à une séquence (a) et au moins 2 nucléotides des 5 nucléotides restants sont identiques respectivement aux deux nucléotides correspondants dans la séquence de référence, après alignement.

- Par "séquence d'identification", on désigne toute séquence ou tout fragment tel que défini ci-dessus, pouvant servir de sonde de détection et/ou de capture.

5 - Par "détection" on entend soit une détection directe par une méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur.

De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques. [Voir par exemple Kricka et al., Clinical Chemistry, 1999, n° 45(4), p.453-458 ou Keller G.H. et al., DNA Probes, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249].

10 Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bétagalactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les 15 chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes 20 optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I .

25 Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

30 Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-91/19812.

35 Un autre mode particulier préférentiel de marquage d'acides nucléiques est décrit dans la demande FR-A-2 780 059 de la Demandante. Un autre mode préférentiel de détection utilise l'activité

exonucléase 5'-3' d'une polymérase, tel que décrit par Holland P.M., PNAS (1991) p 7276-7280.

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO-A-95/08000 et, dans ce cas, la 5 réaction préliminaire d'amplification enzymatique peut ne pas être nécessaire.

- Par "amplification enzymatique", on entend une processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique particulier à l'aide ~~d'amorces spécifiques par l'action d'au moins une enzyme~~. Ainsi, pour

10 l'amplification des acides nucléiques, il existe, entre autres, les techniques suivantes :

- PCR (Polymerase Chain Reaction), telle que décrite dans les brevets US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 et US-A-4,800,159,
- LCR (Ligase Chain Reaction), exposée par exemple dans la demande de brevet EP-A-0 201 184,
- RCR (Repair Chain Reaction), décrite dans la demande de brevet WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995,
- 20 - NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) avec la demande de brevet WO-A-91/02818, et
- TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

On parle alors d'"amplicons" pour désigner les polynucléotides 25 générés par une technique d'amplification enzymatique.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les 30 polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux 35 minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc.

Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

5 - Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés dans les publications de [G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al, 10 Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

15 La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection 20 multiple des espèces à détecter.

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité, capacité de multidétection et identification, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

25 L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

30 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,

- les séquences complémentaires à chacune des séquences

35 SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une

Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO -A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

5 - Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées.

A titre d'illustration, des exemples de ces biopuces sont donnés dans les publications de [G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 1998, n°16, p. 40-44 ; F. Ginot, *Human Mutation*, 1997, n°10, p.1-10 ; J. Cheng et al,

10 Molecular diagnosis, 1996, n°1(3), p.183-200 ; T. Livache et al, *Nucleic Acids Research*, 1994, n° 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng et al, *Nature Biotechnology*, 1998, n° 16, p. 541-546] ou dans les brevets US-A-4,981,783, US-A-5,700,637, US-A-5,445,934, US-A-5,744,305 et US-A-5,807,522.

15 La caractéristique principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes de capture sur les acides nucléiques tout en générant un bruit de fond minimum pour la méthode de détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes de capture permettant ainsi la détection 20 multiple des espèces à détecter.

L'invention décrite ci-après permet de résoudre les problèmes posés par les méthodes précédemment décrites, à la fois en terme de sensibilité, spécificité, capacité de multidétection et identification, tout en étant rapide et facile à mettre en œuvre.

25 L'invention concerne un procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

30 b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, consistant en au moins une séquence, choisie dans les groupes constitués par

- les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
- les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité

35 s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une

température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,

5 - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

10 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

15

Elle concerne en outre un procédé tel que décrit précédemment, 20 caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une même espèce animale d'origine ou de plusieurs 25 espèces animales d'origine respectivement différentes.

Elle concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :
a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences 30 SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec 35 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,

température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou

5 - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides

10 contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

15 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

Elle concerne en outre un procédé tel que décrit précédemment, 20 caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une même espèce animale d'origine ou de plusieurs 25 espèces animales d'origine respectivement différentes.

Elle concerne également toute séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

30 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232, b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider une température comprise entre 20 et 70°C et préférentiellement entre 35 et 65°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M et préférentiellement 0,8 à 1M avec 35 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID

Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Elle concerne également l'utilisation d'une séquence précédemment définie, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce animale.

L'invention peut en outre être une sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

Elle concerne également une amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification précédemment définie.

Un autre mode de réalisation de l'invention est un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique précédemment définie.

Selon l'invention les séquences nucléotidiques ou leurs fragments peuvent être fixés sur un support solide et peuvent constituer une biopuce qui permet la détermination de la multiplicité de signaux ou informations.

Le procédé selon l'invention peut être conduit de manière manuelle, semi-automatique ou automatique, permettant la mise en œuvre d'un moyen de détermination de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

Cette invention concerne également une méthode de détection utilisant en particulier la technique des biopuces. Cette méthode de détection est spécifique des espèces recherchées grâce à l'utilisation de séquences, dites séquences d'identification de chaque espèce, comme sonde. La rapidité, la sensibilité et la spécificité de cette méthode de détection, permettent de l'appliquer indifféremment à tout milieu. En

particulier cette méthode s'applique à tout échantillon de produit alimentaire, comportant de la matière animale quelque soit son état et les procédés de fabrication et/ou d'élaboration mis en œuvre, en particulier les techniques de cuisson, de déshydratation et/ou de conservation, et à tout échantillon de produit manufacturé susceptible de contenir des extraits animaux, comme par exemple les produits cosmétiques et/ou les produits pharmaceutiques comportant par exemple des gélatines d'origine animale.

Cette détection simultanée en une seule étape de multiples produits d'amplifications spécifiques, est possible grâce à l'utilisation de 10 support solide en particulier sous la forme d'un support solide de dimension réduite où sont fixées une multitude de sondes de capture à des positions prédéterminées, ou « biopuce », ces sondes de capture étant constituées par un jeu de fragments ou de la totalité de séquences nucléotidiques spécifiques dites séquences d'identification des espèces recherchées.

15 Ces séquences nucléotidiques peuvent également être mises en œuvre dans toutes les techniques d'hybridation connues comme les techniques de dépôt ponctuel sur filtre dites "DOT-BLOT" [Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], les techniques de transfert d'ADN dites "SOUTHERN BLOT" [Southern E. M., J. Mol. Biol., 1975, 98, 20 503], les techniques de transfert d'ARN dites "NORTHERN BLOT", ou les techniques "SANDWICH" [Dunn A.R. et al., Cell, 1977, 12, 23].

La présente invention concerne également la détermination de groupe d'espèces ou classe d'espèces animales ou taxon. Ces groupes 25 d'espèces ou classes ou taxons sont constitués par exemple de classe, comme la classe des mammifères, les oiseaux ou les poissons, voire de sous groupes d'espèces comme une famille d'oiseaux ou de deux sous-groupes réunis comme les oiseaux ou les mammifères.

Cette identification est possible grâce à l'identification de 30 séquences nucléotidiques, appelées séquences signatures, caractéristiques d'une classe, d'un groupe, d'un sous-groupe ou d'un taxon, et correspondant à des régions conservées pour l'ensemble des individus constituant le groupe.

Toute séquence signature spécifique à une classe d'animaux mises en 35 œuvre dans le procédé selon la présente invention présente la caractéristique selon laquelle, d'une part elle a une région nucléique

conservée pour pratiquement toutes les espèces animales d'une même classe taxonomique, et d'autre part elle peut être discriminée d'autres séquences répondant à la même définition que précédemment, dans les conditions usuelles de détermination, définies de manière générique dans les revendications en annexe.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on utilisera la séquence signature M, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACACAAACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les signatures :

20 O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

30 O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACACTTGCCG GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT ou CA (positions 15101 - 15102) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le

matériel nucléique du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est

5 déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique

10 correspondant aux espèces prédefinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux et les mammifères. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe d'oiseaux et mammifères choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères

15 et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions 14716-14717- 20 14718) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédefinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de poissons choisis. La présence de ces trois 25 bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

30 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec

35 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239,

matériel nucléique du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est

5 déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut

10 rechercher, ici les oiseaux et les mammifères. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe d'oiseaux et mammifères choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères

15 et d'oiseaux dans l'échantillon.

L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239, ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions 14716-14717-14718) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de poissons choisis.

25 La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

30 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,

b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec

35 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

~~Elle concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques~~

10 telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

Elle concerne également l'utilisation des séquences définies 15 précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un groupe 20 d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi 25 le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique 30 constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

Elle concerne également un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état 35 divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos 235 à 239.

c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

Elle concerne plus particulièrement les séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus et caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

Elle concerne également l'utilisation des séquences définies précédemment, c'est à dire caractérisées en ce qu'elles sont constituées d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et correspondant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

Ces séquences dites séquences signatures sont choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239.

Elle concerne également un réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos 235 à 239.

Elle concerne également le procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

5 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,

c) ~~on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et~~

10 d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences signatures choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases

15 ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une classe

20 d'espèces animales d'origine.

Les séquences d'identification peuvent également être mises en œuvre comme amorces spécifiques dans des techniques d'identification par PCR, par mélange de plusieurs amorces choisies parmi les séquences nucléotidiques spécifiques d'une espèce animale en présence d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les milieux à doser, et en ce que au moins une desdites amorces est choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos : 1 à 232, et toutes séquences comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques, choisies parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 240 à SEQ ID N°241 et leur utilisation comme amorces d'amplification universelles, c'est

Elle concerne également le procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- 5 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :
 - 1) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
 - 2) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou
 - 3) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.
- 10 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences signatures choisies parmi le groupe constitué par la séquence nucléotidique constituée des bases CAA en positions 14689-14690-14691 de SEQ ID N°235, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15076-15077 de SEQ ID N°236, de la séquence nucléotidique constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237, de la séquence nucléotidique constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238, et de la séquence nucléotidique constituée des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'une classe d'espèces animales d'origine.

Les séquences d'identification peuvent également être mises en œuvre comme amores spécifiques dans des techniques d'identification par PCR, par mélange de plusieurs amores choisies parmi les séquences nucléotidiques spécifiques d'une espèce animale en présence d'autres espèces susceptibles d'être présentes dans les milieux à doser, et en ce que au moins une desdites amores est choisie parmi le groupe constitué par les séquences SEQ ID Nos : 1 à 232, et toutes séquences comprenant au moins 5 monomères contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques, choisies parmi le groupe constitué des séquences SEQ ID N° 240 à SEQ ID N°241 et leur utilisation comme amores d'amplification universelles, c'est

à dire utilisables pour la détection d'espèces en mélange et suffisamment sensibles vis à vis des différentes espèces pour éviter des résultats erronés dus au masquage de certaines espèces présentes en très faible proportion en raison de trop grande sensibilité vis à vis d'une autre espèce susceptible 5 d'être présente dans un proportion plus importante.

Ces amorce sont utilisées pour la mise en œuvre des étapes d'amplification des procédés précédemment décrits, notamment lorsque les échantillons comprennent ou sont susceptibles de contenir du matériel biologique provenant d'espèces appartenant au groupe des vertébrés.

10 Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Exemple 1 : Détection d'une espèce animale dans un échantillon (tableau 1)

15 a) Préparation de l'échantillon
Des échantillons provenant de plusieurs espèces animales (mammifères, oiseaux, poissons) ont été utilisés dans cet exemple. Ces échantillons se répartissaient en plusieurs catégories :

20 - des échantillons de référence (désignés sous le terme « ref » dans le tableau 1) :

25 ADN de référence de diverses espèces animales : ADN de mammifères (bœuf, chèvre, mouton, porc, lapin, lièvre, renne), ADN d'oiseaux (autruche, poulet, dinde, oie), ADN de poissons (cabillaud, thon albacore, thon listao, merlu, maquereau espagnol, thonine de l'Atlantique, truite arc-en-ciel, truite de mer, saumon de fontaine)

30 - des prélèvements tissulaires effectués au laboratoire selon un protocole classique : prélèvement buccal de chèvre, de chat ; souris

35 - des prélèvements alimentaires, dont la composition exacte et l'origine sont connues : blanquette de veau, bœuf Bourguignon, langue de veau en sauce, rôti d'agneau, rôti de porc, cuisse de poulet,

40 - des échantillons commerciaux (désignés sous le terme « comm » dans le tableau 1), obtenus en grande distribution à base de bœuf (foie de veau, beefsteack, côte de veau, vache à lait, rôti de veau, Parmentier, Bolognaise), de porc (jambon, saucisson, saucisse, porc à la chinoise), d'oiseau (steack d'autruche, poulet rôti, pintade rôti, cuisse de

dinde, oie rôtie), de poisson (anguille d'Europe, filet de morue salée, thon albacore en boite, thon listao en boite, filet de saumon atlantique, maquereau commun, truite arc-en-ciel, omble chevalier).

5 Tous les échantillons sont numérotés (E1 à E57), et cette numérotation a été conservée dans les 5 exemples illustrant l'invention.

Chaque échantillon est placé dans un sac type baglight® (Intersciences) puis malaxé jusqu'à homogénéisation dans un malaxeur type BagMixer® (Intersciences).

10 b) Lyse de 25 mg d'échantillon et purification des ADN totaux
La lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques est réalisée par l'utilisation du Dneasy™ Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504) en appliquant le protocole préconisé par Qiagen pour l'extraction et la purification des acides nucléiques de tissus animaux.

15 c) PCR
Une PCR est réalisée en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de Applied Biosystems suivant le protocole ci dessous. On ajoute à 2µl de la suspension d'ADN total le tampon 10X gold buffer , 3,5mM de MgCl₂,
20 100µM de dNTPs (deoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4µM des amorces euvertébrés telles que décrites par Bartlett et al en 1992 (Biotechniques vol12n°3 p408.412) :

SEQ ID N°233: 5' CCATCCAACA TCTCAGCATG ATGAAA 3'
(séquence CDL)

25 SEQ ID N°234: 5' **GAAATTAATA CGACTCACTA**
TAGGGAGACC ACACCCCTCA GAATGATATT TGTCCCTCA3' (séquence CBHT7, en gras : promoteur de la polymérase T7), afin d'obtenir 50µl de volume réactionnel final.

30 Un premier cycle de PCR de 10 minutes est réalisé à 95°C suivi de 35 cycles composés chacun des 3 étapes suivantes : 94°C pendant 45 secondes, 50°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 2 minutes. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

d) Vérification de l'amplification

Afin de vérifier l'amplification, 5 μ l de produit d'amplification (ou amplicon) sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% dans un tampon EDTA-Tris Borate. Après une migration de 20 minutes à 100 Volts, la bande 5 d'amplification est visualisée par coloration au Bromure d'Ethidium et par illumination aux Ultra Violets. L'amplification est positive comme le démontre la présence d'une bande ayant la taille attendue (350 paires de bases).

10 e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara)

Une biopuce est synthétisée sur un support solide en verre selon le procédé décrit dans le brevet US 5,744,305 (Affymetrix, Fodor et al) en utilisant la stratégie de reséquençage décrite dans la demande WO 15 95/11995 (Affymax, Chee et al) et selon la méthode décrite par A. Troesch et al. (J. Clin. Microbiol., 37(1) : 49-55, 1999).

Chaque séquence d'identification comporte 17 bases, avec une position d'interrogation en 10^{ème} position par rapport à l'extrémité 3' de la séquence.

20 L'analyse est effectuée avec le système complet GeneChip® (référence 900228, Affymetrix, Santa Clara, CA) qui comprend le lecteur GeneArray®, la station fluidique GeneChip® et le logiciel d'analyse GeneChip®.

e. 1. Transcription et marquage des amplicons

25 Grâce à l'amorce antisens CBHT7, tous les produits d'amplification présentent un promoteur pour la RNA polymérase T7. Ces amplicons vont alors servir de matrice à une réaction de transcription au cours de laquelle sera incorporé un ribonucléotide fluorescent.

30 A partir des 50 μ l de produit d'amplification positif, un aliquot de 2 μ l est prélevé et ajouté à un mélange de transcription contenant les composants du nécessaire Megascript T7 (Ambion, ref. 1334) et de fluorescein-12-UTP (Roche, ref. 1427857). Le mélange réactionnel final se fait dans 20 μ l et la réaction de transcription s'effectue pendant 2 heures à 37°C.

e. 2. Fragmentation des transcripts marqués

Afin d'améliorer les conditions d'hybridation, les transcripts marqués sont fragmentés en fragments d'environ 20 nucléotides. Pour cela, les 20 μ l de transcripts marqués sont soumis à l'action de l'imidazole 5 (Sigma) 30mM et du chlorure de manganèse (Merck) 30mM pendant 30 minutes à 65°C.

e. 3. Hybridation sur la puce à ADN

A partir des 20 μ l de transcripts marqués et fragmentés, un aliquot de 7 μ l est prélevé et ajouté à 700 μ l de tampon d'hybridation (SSPE 10 6X (Eurobio), DTAB 5mM (Sigma), Bétaire 3M (Acros), antifoam 0,01% (ref A80082, Sigma), et 250 μ g/ml d'ADN de sperme de hareng (Gibco). Ce mélange est hybridé sur la puce dans les conditions suivantes: 30 minutes à 40°C. Après lavage, la puce est scannée, puis l'image d'hybridation obtenue est analysée par le logiciel GeneChip® (Affymetrix, 15 Santa Clara, CA).

Les spots d'hybridation permettent de reconstituer la séquence de l'amplicon, qui est ensuite comparée aux séquences de références de la puce. La séquence (et donc l'espèce qui lui correspond) qui présente le meilleur pourcentage d'homologie (appelé aussi « base-call », exprimé en 20 %) avec la séquence de l'amplicon est retenue pour l'identification.

e.4. Interprétation des résultats.

Seule une partie de la séquence de 350 bases est analysée pour chaque espèce. Elle correspond à tout ou partie des sondes d'identification. Le seuil d'interprétation, c'est à dire le niveau d'identification est fixé à 25 90% de base-call sur la séquence signature. En dessous de ce seuil, la cible, et donc l'espèce correspondante n'est pas considérée comme identifiée.

f) Résultat

L'ADN extrait de l'échantillon alimentaire donne lieu à un produit 30 d'amplification, puis à une identification sur la puce. Comme présenté dans le tableau 1, les échantillons de référence sont correctement analysés par cette technique, qui permet également la détection d'espèce animale (mammifère, oiseau, poisson) dans des échantillons commerciaux.

Tableau 1 : détection d'une espèce animale dans un échantillon

Espèce animale	Nature de l'échantillon		% base call Séquence signature	Identification sur puce
Bœuf (<i>Bos taurus</i>)	ref	E1: ADN bœuf	Bos taurus 100%	bœuf
		E2: Bourguignon	Bos taurus 100%	bœuf
		E3: langue de veau	Bos taurus 100%	bœuf
		E4: blanquette de veau	Bos taurus 100%	bœuf
	comm	E5: côte de veau	Bos taurus 95%	bœuf
		E6: vache à lait	Bos taurus 100%	bœuf
		E7: rôti de veau	Bos taurus 100%	bœuf
		E8: parmentier	Bos taurus 100%	bœuf
		E9: bolognaise	Bos taurus 100%	bœuf
		E10: beefsteak	Bos taurus 100%	bœuf
		E11: foie de veau	Bos taurus 100%	bœuf
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	ref	E12: ADN chèvre	Capra hircus 100%	chèvre
		E13: Prélèvement buccal	Capra hircus 100%	chèvre
Mouton (<i>Ovis aries</i>)	ref	E14: ADN mouton	Ovis aries 95,5%	mouton
		E15: rôti d'agneau	Ovis aries 100%	mouton
Porc (<i>Sus scrofa</i>)	ref	E16: ADN porc	Sus scrofa 100%	porc
		E17: rôti de porc	Sus scrofa 100%	porc
	comm	E18: jambon	Sus scrofa 100%	porc
		E19: saucisson	Sus scrofa 100%	porc
		E20: saucisse	Sus scrofa 100%	porc
		E21: porc à la chinoise	Sus scrofa 100%	porc
		E22: ADN lapin	Oryctolagus cuniculus 100%	lapin
Lapin (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	ref	E22: ADN lièvre	Lepus cuniculus 100%	lièvre
Lièvre (<i>Lepus cuniculus</i>)	ref	E23: ADN renne	Rangifer tarandus 100%	Renne
Renne (<i>Rangifer tarandus</i>)	ref	E24: souris	Mus musculus 100%	souris
Souris (<i>Mus musculus</i>)	ref	E25: Prélèvement buccal	Felis catus 100%	chat
	ref	E26: ADN autruche	Struthio camelus 100%	Autruche
	comm	E27: steak d'autruche	Struthio camelus 100%	Autruche
Autruche (<i>Struthio camelus</i>)	ref	E28: ADN poulet	Gallus gallus 100%	poulet
		E29: cuisse de poulet	Gallus gallus 94,7%	poulet
	comm	E30: poulet rôti	Gallus gallus 100%	poulet
	comm	E31: Pintade rôtie	Numida meleagris 100%	Pintade
Pintade (<i>Numida meleagris</i>)	ref	E32: ADN dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
		E33: rôti de dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
	comm	E34: cuisses de dinde	Meleagris gallopavo 100%	dinde
Dinde (<i>Meleagris gallopavo</i>)	ref	E35: ADN oie	Anser anser 100%	oie
	comm	E36: oie rôtie	Anser anser 100%	oie
Oie (<i>Anser anser</i>)	comm	E37: poisson entier	Anguilla anguilla 100%	Anguille d'Europe
	ref	E38: ADN cabillaud	Gadus morhua 100%	Cabillaud
Anguille d'Europe (<i>Anguilla anguilla</i>)	comm	E39: filet de morue salée	Gadus morhua 100%	Cabillaud
	ref	E40: ADN thon albacore	Thunnus 100%	thon
Cabillaud (<i>Gadus morhua</i>)	comm	E41: thon albacore en boîte	Thunnus 100%	thon
	ref	E42: ADN thon listao	Thunnus 94,7%	thon
Thon albacore (<i>Thunnus albacares</i>)	comm	E43: thon listao en boîte	Thunnus 94,7%	thon
	comm	E44: filet de saumon d'atlantique	Salmo salar 100%	saumon d'atlantique
Thon listao (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	ref	E45: ADN merlu	Merluccius 94,4%	Merlu
	comm	E46: ADN maquereau espagnol	Scomber japonicus 100%	Maquereau espagnol
Saumon d'atlantique (<i>Salmo salar</i>)	comm	E47: poisson entier	Scomber scombrus 100%	Maquereau commun
	ref	E48: ADN thonine atlantique	Euthynnus alletteratus 100%	Thonine de l'atlantique
Merlu (<i>Merluccius merluccius</i>)	ref	E49: ADN truite arc en ciel	Oncorhynchus mykiss 100%	Truite arc en ciel
	comm	E50: poisson entier	Oncorhynchus mykiss 100%	Truite arc en ciel
Maquereau espagnol (<i>Scomber japonicus</i>)	ref	E51: ADN truite de mer	Salmo trutta fario 100%	Truite de mer
	comm	E52: ADN saumon de fontaine	Salvelinus fontinalis 100%	Saumon de fontaine
Thonine de l'atlantique (<i>Euthynnus alletteratus</i>)	ref	E53: poisson entier	Salvelinus alpinus 100%	Omble chevalier
	comm			
Truite arc en ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	comm			
	ref			
Truite de mer (<i>Salmo trutta fario</i>)	comm			
	ref			
Saumon de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	comm			
	ref			
Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	comm			
	ref			

Exemple 2 : Détection de plusieurs d'espèces animales dans un échantillon (tableau 2)

5 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons, la lyse des échantillons et la purification des ADN totaux, la PCR, la vérification de l'amplification et l'identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont identiques à ce qui est décrit dans l'exemple 1.

10 Dans cet exemple, plusieurs espèces animales sont simultanément analysées à partir d'un même échantillon. L'analyse est réalisée sur :

des échantillons de référence (désignés « ref », comme dans l'exemple 1) constitués par :

15 un mélange d'ADN provenant de deux espèces d'animaux différentes, en proportion 50% de chacune des 2 espèces

un mélange d'amplicons (obtenus selon le protocole de l'exemple 1), en proportion 80% d'amplicons de bœuf et 20% d'amplicons de dinde ; 50% d'amplicons de bœuf et 50% d'amplicons de dinde ; 20% d'amplicons de bœuf et 80% d'amplicons de dinde,

20 des échantillons commerciaux (désignés « comm », comme dans l'exemple 1), issus de la grande distribution, comprenant plusieurs espèces animales dans un même échantillon.

25 Comme présentés dans le tableau 2, ces résultats montrent que des mélanges d'espèces peuvent être détectées simultanément dans un même échantillon, que cet échantillon soit constitué d'un mélange d'ADN, d'un mélange d'amplicons ou d'un échantillon commercial comprenant plusieurs espèces.

Tableau 2 : détection de plusieurs espèces animales dans un échantillon

Nature de l'échantillon		Composition	% base call Séquence signature	Identification sur puce
Ref	Mélange ADN	50% porc (E16) 50 % lapin (E22)	S. scrofa 94,7% O. cuniculus 100%	porc lapin
		50% poulet (E28)	G. gallus 100%	poulet
		50% dinde (E32)	M. gallopoovo 100%	dinde
		50% bœuf (E1)	B. taurus 100%	bœuf
		50% dinde (E32)	M. gallopoovo 100%	dinde
	Mélange amplicons	80% bœuf 20% dinde	B. taurus 100% M. gallopoovo 94,1%	bœuf dinde
		50% bœuf 50% dinde	B. taurus 100% M. gallopoovo 100%	bœuf dinde
		20 % bœuf 80 % dinde	B. taurus 100% M. gallopoovo 100%	bœuf dinde
Comm	E54 : Pâté	porc volaille	S. scrofa 100% M. gallopoovo 94,1%	porc dinde
	E55 : boudin blanc	porc volaille	S. scrofa 100% M. gallopoovo 94,1%	porc dinde

5

Exemple 3: Détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.

a) Préparation de l'échantillon

10 Les conditions expérimentales concernant la préparation des échantillons sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1. Les échantillons sont issus de farines destinées à l'alimentation animale. Ces échantillons (numérotés de F1 à F17) ont été préalablement répertoriés selon 4 catégories, après analyse de la présence de fragments d'os telle
15 que décrite par Michard (Revue de l'Alimentation animale, vol. 508, pp 43-48, 1997 ; technique de référence).

On distingue alors des échantillons « négatifs » lorsque le nombre de fragments d'os est inférieurs à 20, des échantillons « traces » lorsqu'il y a plus de 20 fragments d'os mais une proportion en os présents dans l'échantillon, inférieure à 0,01%, des échantillons « à suivre » lorsque 5 la proportion est comprise entre 0,01% et 1%, et les échantillons « positifs » lorsque la proportion est supérieure à 1%.

b) Lyse de l'échantillon et purification des ADN totaux

Pour la lyse de l'échantillon et la purification des acides nucléiques, on utilise le Dneasy™ Tissue Nécessaire (Qiagen, ref 69504) 10 tel que décrit dans l'exemple 1, à partir de 25 mg de farine. Une adaptation de la technique est réalisée afin d'éliminer les inhibiteurs de la PCR. En effet, ces inhibiteurs (polyphénols, cations (Ca^{2+} , Fe^{3+}), traces de métaux lourds, tanins, carbohydrates, sels (NaCl, nitrites)) sont en quantité importante dans les végétaux, et de ce fait dans les farines destinées à 15 l'alimentation animale. Cette adaptation est la suivante :

1- Après la lyse avec le tampon ATL et la protéinase K, du chelex est ajouté lors de l'étape de purification de l'ADN (200 μ l de InstaGene™ Matrix (BIO-RAD, ref 732-6030)).

2- Après incubation de 30 minutes à 56°C, une centrifugation 20 (5 minutes ; 14000 tours/minutes) est réalisée, et l'extraction est réalisée telle que décrite dans le manuel Dneasy™ Tissue Nécessaire de Qiagen.

c) PCR

On effectue une PCR en utilisant le nécessaire Ampli Taq gold de Applied Biosystems. On ajoute à 10 μ l de la suspension d'ADN total 25 extrait de farines le tampon 10X gold buffer, 3,5mM de $MgCl_2$, 100 μ M de dNTPs (déoxyribonucleosides triphosphates), 2U de Taq gold polymérase, 0,4 μ M des amorces euvertébrés CBL et CBHT7 telles que définies dans l'exemple 1 afin d'obtenir 50 μ l de volume réactionnel final. On réalise un premier cycle de 10 minutes à 95°C de PCR puis 35 cycles composés 30 chacun des 3 étapes suivantes : 94°C 45 sec, 50°C 45 sec, 72°C 2 minutes. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est ensuite réalisée.

d) Vérification de l'amplification

La vérification de l'amplification est réalisée comme décrit dans l'exemple 1.

e) Identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara).

Cette étape d'identification est réalisée telle que décrite dans l'exemple 1.

5 f) Résultat

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3, et comparés aux résultats obtenus par le protocole classique de l'art antérieur. Il y parfaite concordance entre les 2 techniques, mais avec, en plus, l'indication de l'espèce dans le cas de l'invention. L'invention permet 10 de détecter la présence d'une ou plusieurs espèces animales dans des échantillons de farines destinées à l'alimentation animale.

Tableau 3 : détection d'une ou plusieurs espèces animales dans les farines destinées à l'alimentation animale.

15

	Protocole classique		Protocole selon l'invention
	Catégorie	Fragments os	
F1	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F2	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F3	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F4	Négatif	< 20 fragments	Aucune espèce détectée
F5	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F6	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F7	Traces	< 0,01 %	Porc
F8	Traces	< 0,01 %	Aucune espèce détectée
F9	Traces	< 0,01 %	Porc, Souris, Bœuf,
F10	A suivre	0,05 %	Porc, Bœuf
F11	A suivre	0,03 %	Porc, Bœuf
F12	A suivre	0,02 %	Porc, Rat, Bœuf
F13	A suivre	0,01 %	Porc
F14	Positif	0,23 %	Porc, Bœuf
F15	Positif	0,23 %	Bœuf, Porc
F16	Positif	4,70 %	Bœuf, Porc, Souris, Dinde
F17	Positif	3,50 %	Bœuf, Souris, Porc, Poulet

Exemple 4 : détection de la classe des d'espèces contenues dans un échantillon (tableau 4)

5 L'objectif de cet exemple est d'obtenir une technique permettant de détecter la classe de vertébrés (mammifères, oiseaux, poissons...) de l'animal d'origine de l'ingrédient contenu dans un échantillon alimentaire ou un échantillon de farine destinée à l'alimentation animale.

10 Les conditions expérimentales concernant a) la préparation de l'échantillon, b) la lyse de l'échantillon et la purification des ADN totaux, c) la PCR, d) la vérification de l'amplification et e) l'identification de l'amplicon sur une puce à ADN (Affymetrix, Santa Clara) sont similaires à ce qui est décrit dans l'exemple 1 et 3.

15 L'identification de la présence de mammifère et/ou d'oiseaux est déterminée par la présence de signatures spécifiques à chaque classe.

Par exemple, pour la détection de la présence de mammifères on utilisera la séquence signature M, correspondant à la séquence SEQ N°235 GACACAAACAA CAGC, positions 14685 à 14698 (séquence de 20 référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases CAA en positions 14689-14690-14691 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères. On observe au plus 5 25 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de mammifères choisis. La présence de ces trois bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères dans l'échantillon.

30 L'identification de la présence d'oiseaux est déterminée par les signatures :

O1, correspondant à la séquence SEQ N°236 TCCCTAGCCT TCTC, positions 15073 à 15086 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT (positions 15076-15077) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux 35 espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 5 positions mutées pour le reste de la

signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

5 O2, correspondant à la séquence SEQ N°237 ACAC TTGCCG GAAC, positions 15098 à 15111 (séquence de référence *Gallus gallus*; genbank n° accession X52392). Les bases CT ou CA (positions 15101 - 15102) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut
10 rechercher, ici les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe d'oiseaux choisis. La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence d'oiseaux dans l'échantillon.

15 L'identification de la présence de mammifères et d'oiseaux est déterminée par la signature V, correspondant à la séquence SEQ N°238 ATAGCCACAGCATT, positions 14883 à 14896 (séquence de référence *Bos taurus* genbank ; n° accession V00654). Les bases GC (en positions 14886 et 14887) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique 20 correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les mammifères et les oiseaux. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le matériel nucléique du groupe de mammifères et d'oiseaux choisis La présence de ces deux bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de mammifères et d'oiseaux 25 dans l'échantillon.

30 L'identification de la présence de poissons est déterminée par la signature P, correspondant à la séquence SEQ N°239 ATAATAACCTCTTT, positions 14713 à 14726 (séquence de référence *Gadus morhua* ; genbank n° accession X99772). Les bases ATA ou ATG (positions 14716-14717-14718) sont conservées pour l'ensemble du matériel nucléique correspondant aux espèces prédéfinies constituant le groupe que l'on veut rechercher, ici les poissons. On observe au plus 4 positions mutées pour le reste de la signature citée pour l'ensemble des séquences constituant le 35 matériel nucléique du groupe poissons choisis La présence de ces trois

bases aux positions indiquées ci dessus permet ainsi de déterminer la présence de poissons dans l'échantillon.

Comme présenté dans le tableau 4, cette technique permet de détecter la présence de mammifères et/ou d'oiseaux et/ou de poissons, que 5 ces espèces soient présentes isolément ou en mélange.

Tableau 4 : détection de classe d'espèces dans un échantillon

Echantillons	Signatures détectées	interprétation
E1 : ADN bœuf	V et M	mammifère
E16 : ADN porc	V et M	mammifère
E17 : rôti de porc	V et M	mammifère
E12 : ADN chèvre	V et M	mammifère
E13 : chèvre prélèvement buccal	V et M	mammifère
E35 : ADN oie	V et O1 et O2	oiseau
E49 : ADN truite arc en ciel	P	poisson
E51 : ADN truite de mer	P	poisson
Mélange amplicons bœuf / dinde	V et M et O1 et O2	mammifère / oiseau
E15 : rôti d'agneau	V et M	mammifère
F9 : farine « trace »	V et M	mammifère
F1 : farine « négatif »	<i>Pas de signatures positive</i>	<i>pas d'identification</i>
farine	P	poisson

Exemple 5 : amorces universelles d'amplification des vertébrés
(tableau 5a et 5b)

5 L'objectif des expériences présentées dans cet exemple est d'obtenir des amorces encore plus sensibles que celles décrites dans les exemples précédents, et plus universelles pour la détection des espèces en mélanges. En effet, les amorces utilisées dans les exemples 1 à 4 sont très sensibles vis à vis du bœuf, ce qui peut masquer parfois la présence
10 d'autres espèces lorsque elles sont présentes en très faible proportion.

Les amorces utilisées dans cet exemple sont les suivantes :
SEQ ID N°240: 5' GACCTCCCAG CCCCATCAAA 3' (séquence

CBL 20)

SEQ ID N°241: 5' **GAAATTAATA CGACTCACTA**
15 TAGGGAGACC ACACAGAATG ATATTTGTCC TCA 3' (séquence CBHT7
20, avec en gras, la localisation du promoteur de la polymérase T7).

La technique utilisée pour obtenir l'identification sur la puce est telle que décrite dans l'exemple 1a, 1b, 1c (avec les amorces modifiées), 1d, 1e.

20 Comme présenté dans le tableau 5a, l'utilisation de ces nouvelles amorces permettent d'obtenir, chez la dinde, un seuil de détection de l'ordre de 1% par comparaison avec les amorces des exemples 1 à 4 où le seuil de détection était de l'ordre de 10%. L'utilisation de ces nouvelles amorces permettent également, dans des 25 échantillons commerciaux, provenant de la grande distribution, l'identification d'espèces animales, notamment le mouton, présentes à l'état de trace, qui étaient masquées par la présence de bœuf dans les exemples précédents (tableau 5b).

Tableau 5 a : seuil de détection de la dinde en mélange avec du boeuf

% ADN		Détection sur puce: % base call			
		Amorces ex 1 à 4		Amorces ex 5	
E1 : bœuf	E32 : dinde	bœuf	dinde	bœuf	dinde
100	0	100	5,9	100	29,4
99,9	0,1	100	17,6	100	41,2
99	1	100	76,5	100	94,1
90	10	100	100	100	100
50	50	100	100	100	100
1	99	100	100	90	100
0,1	99,9	100	100	60	100
0	100	50	94,1	26,9	100
Seuil de détection		0,10%	10%	1%	1%

5

Tableau 5b : détection du mouton en mélange avec d'autres espèces

Produits commerciaux	composition indiquée	détection sur puce : espèces détectées	
		amorces ex 1 à 4	amorces ex 5
E56 : Kebab Burger	Pain, viande hachée précuite (mouton, bœuf), sauce	Bœuf,	Bœuf Mouton
E57 : Boulette couscous	Bœuf, mouton, végétaux	Bœuf	Bœuf Mouton

10

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

5 a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, choisi dans le groupe constitué par

10 - les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,

- les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une 15 concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,

- les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

20 c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et

d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

25

30 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de 35 signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination d'une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à 5 partir d'au moins ladite espèce, caractérisé en ce que :

- a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif spécifique à l'espèce animale, consistant en au moins une séquence choisie dans les groupes 10 constitués par
 - les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
 - les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une 15 concentration d'environ 0,5 à 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou
 - les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque desdites séquences, et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque 20 séquence.
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la réaction spécifique entre ledit réactif et la fraction nucléique, caractérisant la présence dans ledit échantillon de ladite espèce animale d'origine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on dispose d'un ensemble comprenant une multiplicité desdits réactifs spécifiques à une même espèce d'origine et/ou à des espèces animales 35 d'origine respectivement différentes ; et on détermine une multiplicité de signaux ou informations caractérisant la présence dans ledit échantillon

d'une même espèce animale d'origine et/ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans le groupe constitué par :

- 5 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à
- 10 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232,
- c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
- 15 desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

4. Utilisation d'une séquence selon la revendication 3, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins 20 ladite espèce animale.

5. Sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique 25 d'identification selon la revendication 3.

6. Amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

30 7. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 3.

35 8. Biopuce comprenant un support solide comportant une surface développée, sur laquelle est disposée et fixée une multiplicité de

d'une même espèce animale d'origine et/ou de plusieurs espèces animales d'origine respectivement différentes.

3. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est choisie dans les groupes constitués par :

- 5 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 1 à 232,
- b) les séquences complémentaires à chacune des séquences SED ID Nos 1 à 232 respectivement, la complémentarité s'entendant de toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre 20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à
- 10 1M, avec l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 1 à 232, ou
- c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID Nos 1 à 232 et des séquences selon b) respectivement, l'homologie s'entendant de toute séquence, par exemple fragment comprenant une suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
- 15 desdites séquences et présentant au moins 70% d'identité avec ladite quelconque séquence.

4. Utilisation d'une séquence selon la revendication 3, pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins ladite espèce animale.

5. Sonde pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

6. Amorce pour l'amplification spécifique d'un acide nucléique d'une espèce animale d'origine, comprenant au moins une séquence nucléotidique d'identification selon la revendication 3.

30 7. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 3.

35 8. Biopuce comprenant un support solide comportant une surface développée, sur laquelle est disposée et fixée une multiplicité de

séquences nucléotidiques selon la revendication 3, et ceci selon un arrangement prédéterminé.

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce
5 qu'on détermine la multiplicité de signaux ou informations avec une
biopuce selon la revendication 8.

10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est
choisie dans le groupe constitué par:

10 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences
SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de
toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre
20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec
15 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239,
c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID
Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie
s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une
suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
20 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides
appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un
groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité
avec ladite quelconque séquence.

25 11. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est
constituée d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des
séquences selon la revendication 10 et correspondant à une région
conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11,
caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CAA en positions
14689-14690-14691 de SEQ ID N°235.

35 13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11,
caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15076-
15077 de SEQ ID N°236.

séquences nucléotidiques selon la revendication 3, et ceci selon un arrangement prédéterminé.

9. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce
5 qu'on détermine la multiplicité de signaux ou informations avec une
biopuce selon la revendication 8.

10. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est
choisie dans les groupes constitués par :

10 a) les séquences de référence SEQ ID Nos 235 à 239,
b) les séquences complémentaires à chacune des séquences
SED ID Nos 235 à 239 respectivement, la complémentarité s'entendant de
toute séquence susceptible de s'hybrider à une température comprise entre
20 et 70°C en solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1M avec
15 l'une quelconque des séquences SEQ ID Nos 235 à 239, ou
c) les séquences homologues à chacune des séquences SEQ ID
Nos 235 à 239 et des séquences selon b) respectivement l'homologie
s'entendant de toute séquence, par exemple fragment, comprenant une
suite d'au moins 5 nucléotides contigus inclus dans l'une quelconque
20 desdites séquences ainsi qu'un groupe de deux ou trois nucléotides
appartenant à une région conservée pour l'ensemble des espèces d'un
groupe considéré, et ladite séquence présentant au moins 70% d'identité
avec ladite quelconque séquence.

25 11. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle est
constituée d'un groupe de 2 à 3 nucléotides compris dans l'une des
séquences selon la revendication 10 et correspondant à une région
conservée pour l'ensemble des espèces d'un groupe considéré.

30 12. Séquence nucléotidique selon la revendication 11,
caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CAA en positions
14689-14690-14691 de SEQ ID N°235.

35 13. Séquence nucléotidique selon la revendication 11,
caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15076-
15077 de SEQ ID N°236.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237.

5

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238.

10

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases ATA en positions 14713-14726 de SEQ ID N°239.

17. Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 10.

18. Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

- a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,
- b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,
- c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et
- d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

19. Utilisation des séquences définies dans l'une quelconque des revendications 12 à 16, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

14. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases CT en positions 15101-15102 de SEQ ID N°237.

5

15. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases GC en positions 14886-14887 de SEQ ID N°238.

10

16. Séquence nucléotidique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée des bases ATA en positions 14716-14718 de SEQ ID N°239.

15

17 Réactif pour la détermination d'au moins une espèce animale d'origine, comprenant un support solide, à l'état divisé ou non, sur lequel est fixée une séquence nucléotidique selon la revendication 10.

20

18. Procédé de détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré, caractérisé en ce que :

25

a) on dispose d'une fraction nucléique obtenue à partir dudit échantillon,

25

b) on dispose d'au moins un réactif comprenant une séquence selon la revendication 10,

c) on met en présence la fraction nucléique et ledit réactif, et

d) par détection on détermine tout signal ou information résultant de la présence d'une des séquences selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisant la présence dans ledit échantillon d'un groupe d'espèces animales d'origine.

35

19. Utilisation des séquences définies dans l'une quelconque des revendications 12 à 16, pour la détermination d'un groupe d'espèces animales d'origine dans un échantillon susceptible de contenir un ingrédient obtenu à partir d'au moins une espèce animale appartenant au dit groupe d'espèces animales considéré.

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> BioMérieux

<120> Procédé de détection et/ou d'identification de l'espèce animale d'origine de la matière animale contenue dans un échantillon.

<130> B05B3851FR/ANIFRAUD

<160> 241

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 1

ctcctactgg ctatgcac

18

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 2

gtaatcctac tgctcactc

19

<210> 3

<211> 38

<212> ADN

<213> Anas platyrhynchos

<400> 3

ttcgatctc tgctcgccat ctgcctggcc acacaaat

38

<210> 4
<211> 24
<212> ADN
<213> Anas platyrhynchos

<400> 4
gacacatccc ttgctttctc ctca

24

<210> 5
<211> 33
<212> ADN
<213> Anser anser

<400> 5
ctcccttcta gccatctgct tagccacaca aat

33

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Anser anser

<400> 6
ccgcagacac ttcactcgcc t

21

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Anser anser

<400> 7
caacggtgct tcgctttctt ttatc

25

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Anser anser

<400> 8

cacttcactc gccttctc

18

<210> 9

<211> 16

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 9

aacctgcacg ccaatg

16

<210> 10

<211> 35

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 10

gggtccctcc tcgccccatgg cctggtcacc caaat

35

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> Cairina moschata

<400> 11

gtcctgcccattt ggggaca

17

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> *Cairina moschata*

<400> 12
ctcctactcg ccctcatggc aa

22

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> *Cairina moschata*

<400> 13
atccgcaacc tgcacgccaa

20

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

<213> *Cairina moschata*

<400> 14
tcctcagtgg ctaacacatg tcga

24

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> *Rangifer tarandus*

<400> 15
cgagacgtca attatgg

17

<210> 16

<211> 17

<212> ADN

<213> *Rangifer tarandus*

<400> 16

<211> 16
<212> ADN
<213> *Columba palumbus*

<400> 21
ttgcttaactc aaatcc

16

<210> 22
<211> 17
<212> ADN
<213> *Columba palumbus*

<400> 22
acccttatacg ccactgc

17

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> *Columba palumbus*

<400> 23
ggcttactac tcgccccaca tta

23

<210> 24
<211> 17
<212> ADN
<213> *Columba palumbus*

<400> 24
ctaaccggct tactact

17

<210> 25
<211> 23
<212> ADN

<213> *Columba palumbus*

<400> 25
ggcatttgct tgctaactca aat

23

<210> 26

<211> 19

<212> ADN

<213> *Acipenser baerii*

<400> 26
ctcactcata ggccctctgc

19

<210> 27

<211> 17

<212> ADN

<213> *Acipenser baerii*

<400> 27
tggctcactc ataggcc

17

<210> 28

<211> 17

<212> ADN

<213> *Coturnix coturnix*

<400> 28
ctgcttctca cactaat

17

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

<213> *Coturnix coturnix*

<400> 29

tcacccggcct tctact	16
<210> 30	
<211> 16	
<212> ADN	
<213> <i>Coturnix coturnix</i>	
<400> 30	
tagcaatatg cctcat	16
<210> 31	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> <i>Sardina pilchardus</i>	
<400> 31	
cttcggatcg cttcttggcc t	21
<210> 32	
<211> 24	
<212> ADN	
<213> <i>Sardina pilchardus</i>	
<400> 32	
ctccttcttt tggtcatgt aact	24
<210> 33	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> <i>Sardina pilchardus</i>	
<400> 33	
gggcgagggc tctattatgg	20
<210> 34	

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 34

atggggcgag ggctctca

17

<210> 35

~~<211> 20~~

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 35

gttgtcctcc ttcttttgg

20

<210> 36

<211> 16

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 36

atggagcatc tttttt

16

<210> 37

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 37

ttggttatgt cttaccg

17

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 38

tggcctctgt cttagcgcccc agattctgac agggttgttc ttagccat

48

<210> 39

<211> 21

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 39

tgattcgaag tatgcacgca a

21

<210> 40

<211> 17

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 40

tttgtatata cggccac

17

<210> 41

<211> 19

<212> ADN

<213> *Sardina pilchardus*

<400> 41

cctctgacat cgcaaccgc

19

<210> 42

<211> 19

<212> ADN

<213> *Anguilla anguilla*

<400> 42

11

ataccctttac atagaaaca

19

<210> 43

<211> 16

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 43

gtggggatatg ttctcc

16

<210> 44

<211> 18

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 44

tccctattag cagtctgc

18

<210> 45

<211> 19

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 45

tcatccggaa tctccacgc

19

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 46

catctgtatc ttcccttcaca t

21

<210> 47

12

<211> 23
<212> ADN
<213> Gallus gallus

<400> 47
gtagcccaaca cttgccggaa cgt

23

<210> 48
<211> 17
<212> ADN
<213> Scomber japonicus

<400> 48
ggacttttcc tcgcaat

<210> 49
<211> 23
<212> ADN
<213> Scomber japonicus

17

<400> 49
tgcctaattt ctcaaattct cac

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
<213> Scomber japonicus

23

<400> 50
ttcggctcac tgcttggct

<210> 51
<211> 20
<212> ADN

20

<213> *Scomber japonicus*

<400> 51
caactacaccc ccgatgttga

20

<210> 52

<211> 25

<212> ADN

<213> *Scomber japonicus*

<400> 52
tccttaccttt tcatggaaac atgaa

25

<210> 53

<211> 36

<212> ADN

<213> *Scomber japonicus*

<400> 53
accccccgttgatg ttgagtcagc attcgactca gtcgcc

36

<210> 54

<211> 18

<212> ADN

<213> *Anguilla japonica*

<400> 54
tatggatgtat tcatccga

18

<210> 55

<211> 21

<212> ADN

<213> *Anguilla japonica*

<400> 55

gatgattcat ccgaaattta c

21

<210> 56

<211> 17

<212> ADN

<213> *Anguilla japonica*

<400> 56

ataataactg cattcgt

17

<210> 57

<211> 19

<212> ADN

<213> *Meleagris gallopavo*

<400> 57

tattatggtt cgtacctat

19

<210> 58

<211> 17

<212> ADN

<213> *Meleagris gallopavo*

<400> 58

aacctccatg cgaatgg

17

<210> 59

<211> 26

<212> ADN

<213> *Meleagris gallopavo*

<400> 59

gcagacacca ctcttgcatt ctcttc

26

<210> 60

<211> 27

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 60
ttctcttctg tggcctacac atgcccga

27

<210> 61

<211> 17

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 61
tgcctcatca ctcaaat

17

<210> 62

<211> 18

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 62
cttaaccggc ctcctact

18

<210> 63

<211> 28

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 63
caggagtatg cttaacttctc accctcat

28

<210> 64

<211> 18

<212> ADN

<213> Meleagris gallopavo

<400> 64
ctcactcactc aaatctta

18

<210> 65

<211> 16

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 65
ctcctcgtaa tgatga

16

<210> 66

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 66
ttccttgcaa tgcacta

17

<210> 67

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 67
atgaaacgta ggtgttagtc

19

<210> 68

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 68

ggtgttagtcc tcctctt

17

<210> 69

<211> 19

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 69

tcatccgcaatcatgcacgc

19

<210> 70

<211> 33

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 70

tacacgccccg acgtcgaatc agcattcaac tca

33

<210> 71

<211> 17

<212> ADN

<213> Scomber scombrus

<400> 71

ggttccctgc ttgggtct

17

<210> 72

<211> 17

<212> ADN

<213> Anguilla mossambica

<400> 72

aatggagctt ctttctt

17

<210> 73

18

<211> 26
<212> ADN
<213> *Anguilla mossambica*

<400> 73
ggactatgtc ttatctctca aatcct

26

<210> 74
<211> 20
<212> ADN
<213> *Canis familiaris*

<400> 74
tatccgctat atgcacgcaa

20

<210> 75
<211> 21
<212> ADN
<213> *Canis familiaris*

<400> 75
ggagtatgct tgattctaca g

21

<210> 76
<211> 18
<212> ADN
<213> *Canis familiaris*

<400> 76
cggatcctat gtattcat

18

<210> 77
<211> 24
<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 77
acatttggaaat tgtactatatta ttccg

24

<210> 78

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 78
actattatttc gcaacc

16

<210> 79

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 79
atttatccgct atatgc

16

<210> 80

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 80
caggtttatt cttagc

16

<210> 81

<211> 16

<212> ADN

<213> Canis familiaris

<400> 81

..

20

gcaaccatag ccacag

16

<210> 82

<211> 18

<212> ADN

<213> *Canis familiaris*

<400> 82

aaatggcgct tccatatt

18

<210> 83

<211> 16

<212> ADN

<213> *Canis familiaris*

<400> 83

taggagttatg cttgat

16

<210> 84

<211> 16

<212> ADN

<213> *Numida meleagris*

<400> 84

gacccaaatt atcacc

16

<210> 85

<211> 19

<212> ADN

<213> *Numida meleagris*

<400> 85

atcccttccta gcagtcgtgc

19

<210> 86

<211> 16
<212> ADN
<213> Numida meleagris

<400> 86
atgacccaaa ttatca

16

<210> 87

<211> 18
<212> ADN
<213> Numida meleagris

<400> 87
tgtcgaaaatg tccaaatac

18

<210> 88
<211> 18
<212> ADN
<213> Equus asinus

<400> 88
agacactaca actgcctt

18

<210> 89
<211> 16
<212> ADN
<213> Equus asinus

<400> 89
gctcctacac attcct

16

<210> 90
<211> 17
<212> ADN

<213> *Equus asinus*

<400> 90
atcagacact acaactg

17

<210> 91

<211> 18

<212> ADN

<213> *Equus asinus*

<400> 91
tgcctcttta tccacgta

18

<210> 92

<211> 16

<212> ADN

<213> *Auxis thazard*

<400> 92
ttggcgtagt tcttct

16

<210> 93

<211> 29

<212> ADN

<213> *Equus caballus*

<400> 93
cagatgaatt atccaccatc tccatgcta

29

<210> 94

<211> 23

<212> ADN

<213> *Equus caballus*

<400> 94

23

atgtgaacta cagatgaatt atc

23

<210> 95

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 95

~~ttctccatatt ttccatgtatatgc~~

25

<210> 96

<211> 23

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 96

~~tcctagctat atactacaca tca~~

23

<210> 97

<211> 25

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 97

~~gaaatattgg gatttcctta tttct~~

25

<210> 98

<211> 18

<212> ADN

<213> Equus caballus

<400> 98

~~gccttccttg gttccctc~~

18

<210> 99

<211> 22
<212> ADN
<213> Equus caballus

<400> 99
tctcatctgt tatacacatc tg 22

<210> 100
<211> 23
<212> ADN
<213> Equus caballus

<400> 100
tcacgttagga caaggccctt act 23

<210> 101
<211> 23
<212> ADN
<213> Equus caballus

<400> 101
gcctttacta cagtcctac acc 23

<210> 102
<211> 21
<212> ADN
<213> Equus caballus

<400> 102
ctttggttcc cacctaggaa t 21

<210> 103
<211> 16
<212> ADN

<213> *Equus caballus*

<400> 103
tccccaccttag gaatct

16

<210> 104

<211> 19

<212> ADN

<213> *Equus caballus*

<400> 104
tgcctcttta ttcacgtag

19

<210> 105

<211> 17

<212> ADN

<213> *Euthynnus alletteratus*

<400> 105
attgggtgttag tacttct

17

<210> 106

<211> 17

<212> ADN

<213> *Euthynnus alletteratus*

<400> 106
tttgcattta ctcacac

17

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> *Euthynnus alletteratus*

<400> 107

ggcctgttcc tcgcaat

17

<210> 108

<211> 16

<212> ADN

<213> *Euthynnus alletteratus*

<400> 108

gcatttactc acacat

16

<210> 109

<211> 17

<212> ADN

<213> *Xiphias gladius*

<400> 109

tatgtattac cctgagg

17

<210> 110

<211> 30

<212> ADN

<213> *Xiphias gladius*

<400> 110

gacatcgcgaa cggcctttac atccgttagca

30

<210> 111

<211> 16

<212> ADN

<213> *Xiphias gladius*

<400> 111

ccctcctcgg cctctg

16

<210> 112

<211> 21
<212> ADN
<213> Xiphias gladius

<400> 112
ggcctgtttc tcgctataca c

21

<210> 113

~~<211> 29~~

<212> ADN
<213> Xiphias gladius

<400> 113
tctgttttagc tgcccaagtc ctcacaggc

29

<210> 114

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 114
ctcggcctct gtttagc

17

<210> 115

<211> 17

<212> ADN

<213> Xiphias gladius

<400> 115
tccttatctat acaaaga

17

<210> 116

<211> 19

<212> ADN

<213> *Xiphias gladius*

<400> 116
catcagacat cgcgacggc

19

<210> 117

<211> 16

<212> ADN

<213> *Gadus morhua*

<400> 117
tgactaattc ggaata

16

<210> 118

<211> 20

<212> ADN

<213> *Gadus morhua*

<400> 118
catgctaattg gtgcctttt

20

<210> 119

<211> 17

<212> ADN

<213> *Gadus morhua*

<400> 119
ggttccatc tttttgt

17

<210> 120

<211> 17

<212> ADN

<213> *Phasianus colchicus*

<400> 120

29

aaacactgga gtcgtcc

17

<210> 121

<211> 16

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 121

gaaatgtgca gtacgg

16

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 122

ggttccctgc tagcagtatg

20

<210> 123

<211> 18

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 123

actggcctcc tattagcc

18

<210> 124

<211> 17

<212> ADN

<213> Phasianus colchicus

<400> 124

tgccttatta ctcaaat

17

<210> 125

<211> 18
<212> ADN
<213> Phasianus colchicus

<400> 125
tgtcgaatg tgca^{gtac} 18

<210> 126
<211> 17
<212> ADN
<213> Struthio camelus

<400> 126
accggcg^{tta} tc^ct^cc^t 17

<210> 127
<211> 20
<212> ADN
<213> Struthio camelus

<400> 127
tgaaacac^{cg} gc^{gtt}tat^{cct} 20

<210> 128
<211> 18
<212> ADN
<213> Struthio camelus

<400> 128
ttttggat^{cg} ctactagg 18

<210> 129
<211> 24
<212> ADN

<213> **Struthio camelus**

<400> 129
cagtacggat gatttatccg caat

24

<210> 130

<211> 17

<212> ADN

<213> **Struthio camelus**

<400> 130
cacacatgcc ggaacgt

17

<210> 131

<211> 23

<212> ADN

<213> **Struthio camelus**

<400> 131
tcctactaac attaatagca act

23

<210> 132

<211> 16

<212> ADN

<213> **Struthio camelus**

<400> 132
aattttggat cgctac

16

<210> 133

<211> 20

<212> ADN

<213> **Struthio camelus**

<400> 133

ctaacagggc tcctactagc

20

<210> 134

<211> 16

<212> ADN

<213> Struthio camelus

<400> 134

cacagccgac actaca

16

<210> 135

<211> 18

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 135

ctgtcgcgac gttaat

18

<210> 136

<211> 23

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 136

cctacacattt ctcagagaca tga

23

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

<213> Felis catus

<400> 137

tatctgcctg tacatacatg t

21

<210> 138

<211> 17

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 138

attggaaatca tactatt

17

<210> 139

<211> 23

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 139

acagctttta tgggatacgt cct

23

<210> 140

<211> 25

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 140

caccggcctc tttttggcca tacac

25

<210> 141

<211> 25

<212> ADN

<213> *Felis catus*

<400> 141

ggaatcatac tattatattac agtca

25

<210> 142

<211> 22

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 142
accagacgcc tcaaccgcct tt

22

<210> 143

<211> 23

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 143
tcctcctgct tgcaactata gca

23

<210> 144

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 144
ctcactcctt ggccctgcc tgatcctcca aat

33

<210> 145

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 145
tccaaatcac cacaggacta

20

<210> 146

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 146

atcgccccaca tcactcgaga

20

<210> 147

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 147

~~ctcaccagac gcttcaa~~

17

<210> 148

<211> 29

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 148

~~ttacggatca ttctctact cagaaacct~~

29

<210> 149

<211> 18

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 149

~~atctgcctct tcctacac~~

18

<210> 150

<211> 16

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 150

~~ccatgacta ctcacc~~

16

<210> 151

<211> 17

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 151

tcctccaaat caccaca

17

<210> 152

<211> 17

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 152

catgcttaacg gtgcctc

17

<210> 153

<211> 20

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 153

tttttatttg tctctatata

20

<210> 154

<211> 19

<212> ADN

<213> Gadus ogac

<400> 154

tttgctctca tatacatat

19

<210> 155

<211> 18

<212> ADN

<213> *Bison bison*

<400> 155
cttctactta cagtaata

18

<210> 156

<211> 18

<212> ADN

<213> *Bison bison*

<400> 156
cgggctttat accttcct

18

<210> 157

<211> 17

<212> ADN

<213> *Lepus europaeus*

<400> 157
tccttaactgg cttatcc

17

<210> 158

<211> 23

<212> ADN

<213> *Lepus europaeus*

<400> 158
ggctctctat tgggattatg cct

23

<210> 159

<211> 18

<212> ADN

<213> *Lepus europaeus*

<400> 159

aataatccag atcctaac	18
<210> 160	
<211> 16	
<212> ADN	
<213> Lepus europaeus	
<400> 160	
ctaataatcc agatcc	16
<210> 161	
<211> 22	
<212> ADN	
<213> Lepus europaeus	
<400> 161	
gactcattcg ttacttacac gc	22
<210> 162	
<211> 26	
<212> ADN	
<213> Euthynnus pelamis	
<400> 162	
tataccccc acgtagaatc agcctt	26
<210> 163	
<211> 19	
<212> ADN	
<213> Euthynnus pelamis	
<400> 163	
atttactccc atattggcc	19
<210> 164	

<211> 18

<212> ADN

<213> *Euthynnus pelamis*

<400> 164

ctgcatttac tcccatat

18

<210> 165

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 165

attctttata tgccta

16

<210> 166

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 166

tctttatatg cctatt

16

<210> 167

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 167

ctttggctcg ctacta

16

<210> 168

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 168
ttggctcgct actagg

16

<210> 169

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus giganteus*

<400> 169
atattctta tatgcc

16

<210> 170

<211> 20

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 170
ctatttctag cgatacatta

20

<210> 171

<211> 23

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 171
tcctacttat tcatacgagac ctg

23

<210> 172

<211> 17

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 172

aacggcgctt ctttctt

17

<210> 173

<211> 24

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 173

aggcctctgc ttagccgccc aaat

24

<210> 174

<211> 22

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 174

ctcatccgtc gtacacatct gc

22

<210> 175

<211> 23

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 175

ggagttgtac tattccctttt agt

23

<210> 176

<211> 19

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 176

tttagccgccc aaatcttaa

19

<210> 177

.....

<211> 34

<212> ADN

<213> *Merluccius merluccius*

<400> 177

cattataccg caaacgtcga gatagcttc tcat

34

<210> 178

<211> 16

<212> ADN

<213> *Bos taurus*

<400> 178

tcaatgtttt ttatct

16

<210> 179

<211> 17

<212> ADN

<213> *Bos taurus*

<400> 179

tcctctgtta cccatat

17

<210> 180

<211> 24

<212> ADN

<213> *Bos taurus*

<400> 180

gtaatccttc tgctcacagt aata

24

<210> 181

<211> 17

<212> ADN

<213> *Macropus rufus*

<400> 181
ggctcatatc tctacaa

17

<210> 182

<211> 17

<212> ADN

<213> *Macropus rufus*

<400> 182
aggagcctgc ttaat

17

<210> 183

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus rufus*

<400> 183
gattgatccg caatct

16

<210> 184

<211> 16

<212> ADN

<213> *Macropus rufus*

<400> 184
tacggctgat tgatcc

16

<210> 185

<211> 16

<212> ADN

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 185

gtttgccaca tctgcc

16

<210> 186

<211> 17

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 186

ctatgttag ctaccca

17

<210> 187

<211> 20

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 187

tataacctccg acatttcaac

20

<210> 188

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 188

cctggaatat cggagt

16

<210> 189

<211> 16

<212> ADN

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 189

tcattcgaaa catcca

16

<210> 190

<211> 19

<212> ADN

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 190

ttgtactttt acttctcac

19

<210> 191

<211> 16

<212> ADN

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 191

gctcgtacctt ctacaa

16

<210> 192

<211> 17

<212> ADN

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 192

gagttgtactt ttacttt

17

<210> 193

<211> 20

<212> ADN

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 193

cgagatgtta gttacggctg

20

<210> 194

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 194

gtacttctac tgttcgca

18

<210> 195

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 195

caggtctttt cttagc

16

<210> 196

<211> 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 196

tttgggtccc ttctagg

17

<210> 197

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 197

gtctgcctaa tagtccaaat c

21

<210> 198

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 198
atcattacag gtcttttctt a 21

<210> 199

<211> 17

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 199
ttccttcatg tcggacg 17

<210> 200

<211> 18

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 200
taatagtcca aatcatta 18

<210> 201

<211> 16

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 201
attggagtagc ttctac 16

<210> 202

<211> 16

<212> ADN

<213> Salmo salar

<400> 202
gagttgtact tctact 16

<210> 203
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Salmo salar

<400> 203
 taggcctatg tctagcc

17

<210> 204
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Salmo salar

<400> 204
 gatgttagct atggctga

18

<210> 205
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Salmo salar

<400> 205
 tacttctact tctcac
 <210> 206

16

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Salmo salar

<400> 206
 ctcatccgta acattcacgc

20

<210> 207
 <211> 16

<212> ADN

<213> Capra hircus

<400> 207

tattcataca tatcgg

16

<210> 208

<211> 19

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 208

taggcctgtg ccttataat

19

<210> 209

<211> 16

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 209

attcaaattt tcactg

16

<210> 210

<211> 18

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 210

tctctactag gcctgtgc

18

<210> 211

<211> 21

<212> ADN

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 211		
tcaaatttc actggcctat t		21
<210> 212		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Oryctolagus cuniculus		
<400> 212		
tgccttataa ttcaaatt		17
<210> 213		
<211> 25		
<212> ADN		
<213> Rattus norvegicus		
<400> 213		
acactacacg tctgataccaa taaca		25
<210> 214		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Rattus norvegicus		
<400> 214		
ctatttgcaag tcatacg		17
<210> 215		
<211> 17		
<212> ADN		
<213> Rattus norvegicus		
<400> 215		
ggatcctaca ctttcct		17

51

<210> 216
<211> 22
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 216
atgcctcata gtacaaatcc tc

22

<210> 217
<211> 21
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 217
aaacattggg atcattctac t

21

<210> 218
<211> 17
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 218
ttcctccatg tgggacg

17

<210> 219
<211> 16
<212> ADN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 219
gtatgcctca tagtac
<210> 220

16

<211> 19
<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 220
tcatccggaa tatccacgc

19

<210> 221

<211> 22

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 221
tggagtagta ttactacttc ta

22

<210> 222

<211> 23

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 222
ggcctatgtt tggccaccca aat

23

<210> 223

<211> 23

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 223
tacttctaac tataatgact gcc

23

<210> 224

<211> 16

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 224

ttggttcact cttagg

16

<210> 225

<211> 18

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 225

~~ttttccctctg tgcgtccat~~

18

<210> 226

<211> 21

<212> ADN

<213> *Salvelinus alpinus*

<400> 226

cctctgtgtg ccataatctgc c

21

<210> 227

<211> 16

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 227

tattattact tctcac

16

<210> 228

<211> 25

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 228

~~tattggggta gtattattac ttctc~~

25

<210> 229

<211> 19

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 229

tctgtatgcc acatttgtc

19

<210> 230

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 230

ctcactataa tgacagcttt

20

<210> 231

<211> 23

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 231

tccgatattt cgacagcttt ttc

23

<210> 232

<211> 20

<212> ADN

<213> *Salvelinus fontinalis*

<400> 232

atttatatgc atatcgcccg

20

<210> 233

<211> 26

<212> ADN

<213> amorce sequence CDL

<400> 233
ccatccaaca tctcagcatg atgaaa 26
<210> 234

<211> 58

<212> ADN

<213> amorce sequence CBHT7

<400> 234
gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaccctca gaatgatatt tgcctca 58

<210> 235

<211> 14

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 235
gacacaacaa cagc 14

<210> 236

<211> 14

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 236
tcccttagcct tctc 14

<210> 237

<211> 14

<212> ADN

<213> Gallus gallus

<400> 237
acacttgccg gaac 14

<210> 238

<211> 14

<212> ADN

<213> Bos taurus

<400> 238

atagccacag catt

14

<210> 239

<211> 14

<212> ADN

<213> Gadus morhua

<400> 239

ataataacct cttt

14

<210> 240

<211> 20

<212> ADN

<213> amorce sequence CBL 20

<400> 240

gacctcccaag ccccatcaa

20

<210> 241

<211> 53

<212> ADN

<213> amorce séquence CEHT7 20

<400> 241

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacagaatg atatttgtcc tca

53

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

 26 bis, rue de Saint Pétersbourg
 75800 Paris Cedex 08
 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1... / 2...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 V/26099

Vos références pour ce dossier (facultatif)	IT/SC/B05B3851FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02.00265
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)	
PROCEDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON	
LE(S) DEMANDEUR(S) :	
BIO MERIEUX	

DESIGNANT EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		MABILAT	
Prénoms		Claude	
Adresse	Rue	5 rue du Manoir	
	Code postal et ville	69650	SAINT GERMAIN AU MONT D'OR / FR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		DESVARENNE	
Prénoms		Sabine	
Adresse	Rue	170 rue Emile Zola	
	Code postal et ville	69150	DECINES CHARPIEU / FR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BABOLA	
Prénoms		Odile	
Adresse	Rue	25 rue Albert Thomas	
	Code postal et ville	69150	DECINES CHARPIEU/ FR
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S)			
DU (DES) DEMANDEUR(S)			
OU DU MANDATAIRE			
(Nom et qualité du signataire)			
Dominique GUERRE			
CPI 921104			
22 FEV. 2002			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 . / 2 .

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W/260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IT/SC/B05B3851FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.00265	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION DE L'ESPECE ANIMALE D'ORIGINE DE LA MATIERE ANIMALE CONTENUE DANS UN ECHANTILLON			
LE(S) DEMANDEUR(S) : BIO MERIEUX			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		LACROIX	
Prénoms		Bruno	
Adresse	Rue	33 chemin de Montlouis	
	Code postal et ville	69230	SAINT GENIS LAVAL / FR
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Dominique GUERRE CPI 921104 22 FEV 2002			



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.